DAS DIFFERENTIALZELLBILD DER SYNOVIALFLÜSSIGKEIT

EINE FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG

Michael Stacheter

Diss. München
1983

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. H. Spiess

DAS DIFFERENTIALZELLBILD DER SYNOVIALFLÜSSIGKEIT - EINE FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Stacheter

aus

Feldkirchen-Westerham

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Suschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Spiess

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.6.1983

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG 1

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Problemstellung 4

2. Material und Methode 4

3. Ergebnisse 8

3.1. Entzündliche Fälle 8

3.2. Nichtentzündliche Fälle 11

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse 12

4. Auswertung der Ergebnisse 14

4.1. Vergleich der Differentialsynoviazellbilder bei entzündlichen und nichtentzündlichen Gelenkerkrankungen 14

4.2. Vergleich der Differentialsynoviazellbilder bei verschiedenen Schweregraden entzündlicher Gelenkerkrankungen 16

4.2.1. Vergleich: Chronische Polyarthritis - HLA-B 27- positive Monarthritis 16

4.2.2. Abhängigkeit von entzündlichen klinischen Parametern 17

4.3. Färbung der Synovialflüssigkeit nach Pappenheim 17

4.4. Ursachen von Fehlern zufälliger und systematischer Art 17

III. DISKUSSION

1. Degranulation von Granulozyten und lysosomale Enzyme 20

2. Möglicher Stellenwert der Pseudoisocyaninchlorid-Färbung in der diagnostischen Gelenkpunktion 22

3. Bisherige Unvollkommenheit der Methode 24

IV. ZUSAMMENFASSUNG 25

V. LITERATURVERZEICHNIS 26

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546827_0023

I. EINLEITUNG

Die Synovialflüssigkeit

Die Synovialflüssigkeit ist für die Elektrolyte und die meisten Nichtelektrolyte ein Dialysat des Blutserums; die makromolekularen Bestandteile, insbesondere die Proteine, gelangen nur teilweise -durch Gelfiltration des Blutserums über die Synovialdeckschicht- in die Synovialflüssigkeit.

Als spezifisches Sekretionsprodukt der Synoviazellen wird die Hyaluronsäure produziert, welche vor allem für die Viskosität und Viskoelastizität der Synovia verantwortlich ist.

Synoviaanalyse

Die klinisch-chemische Analyse der Synovialflüssigkeit liefert wichtige Hinweise zur Differenzierung verschiedener Gelenkerkrankungen.

Routine-Untersuchungen:

-Aussehen: Farbe, Trübung, Gerinnsel, Viskosität
-Kultur: aerob und anaerob
-Zellzahl und Zelldifferenzierung (+ Suche nach LE-Zellen)
-qualitativer Hyaluronsäuretest (Muzinfällungstest)
-Glucose (parallel dazu Blutzucker)
-Untersuchung auf Kristalle (in Flüssigkeit und Zellen)
-Untersuchung der Zellen auf Einschlüsse (Phasenmikroskop)

Spezielle Untersuchungen:

-Komplement
-Rheumafaktor
-Antinukleäre Antikörper
-Eiweiß (parallel dazu Plasmaproteinanalyse)
-Hyaluronsäure quantitativ
-Lipide quantitativ
-Enzyme

(nach 1)

Die unter normalen Umständen gelb gefärbte und klare Synovialflüssigkeit ist in Abhängigkeit von Zell- bzw. Kristallgehalt trübe. Blutige Färbung weist auf ein Trauma (auch Punktionstrauma) hin.

Die polarisationsoptische Darstellung vorhandener Kristalle kann das Vorliegen einer Gicht bzw. Chondrokalzinose erkennen lassen.

Die Viskosität, abhängig vom Polymerisationsgrad der Hyaluronsäure, erniedrigt sich bei Arthrosen, mehr aber bei Arthritiden. Die Viskosität kann gemessen werden, wird aber meist subjektiv beurteilt.
Der Muzin-Fällungstest weist qualitativ den Grad der Polymerisation des Hyaluronats nach; der Niederschlag bleibt bei entzündlichen Gelenkerkrankungen flockig.
Die Bildung von Gerinnseln im Punktat findet nur unter pathologischen Bedingungen statt; in der normalen Synovia fehlen Fibrinogen und verschiedene andere Gerinnungsfaktoren.

Die Glukosekonzentration der Synovialflüssigkeit ist bei entzündlichen -im Gegensatz zu nichtentzündlichen- Gelenkerkrankungen erniedrigt.
Die Laktatkonzentration liefert u.a. einen wichtigen Beitrag zur Erkennung septischer Arthritiden (s. Diskussion).

Das Gesamteiweiß der Synovialflüssigkeit liegt deutlich unter dem des Blutserums. Es steigt insbesondere bei entzündlichen Gelenkerkrankungen an.

Der Rheumafaktor kann bei chronischer Polyarthritis außer im Blut oft zugleich in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden. Selten liegt er in der Synovia allein vor.

<u>Zellzahl und Zelldifferenzierung</u>
Die normale Synovia ist relativ zellarm. Die Zahl der Leukozyten ist unter 200/μl, selbst bei peripherer Blutleukozytose. Mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten) herrschen vor; die Granulozyten machen weniger als 30 % der Gesamtzellen aus.

Erythrozyten gelangen nur anläßlich eines Traumas in die Synovia.

Eine Zunahme der Zellzahl und des relativen Anteils an Granulozyten wird besonders bei entzündlichen Gelenkerkrankungen beobachtet, wie nachstehende Zusammenstellung grob darstellt:

	Zellzahl/µl (Mittel)	Granulozyten
Normal	< 200	< 25 %
Arthrose	< 2000	< 30 %
Arthritis	ca. 15000	> 50 %
Septische Arthritis	> 50 000	> 90 %

(nach 1)

Es ist jedoch zu beachten, daß eine breite Streuung der Zahlenwerte besteht, sodaß sich die Bereiche überschneiden. Daher kann eine Festlegung der Diagnose allein auf Grund der Zelldifferenzierung nicht erfolgen.

Besondere Zellen

Ragozyten sind Einschlüsse tragende Leukozyten. Sie kommen hauptsächlich bei chronischer Polyarthritis vor, seltener bei anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen. Die Vermutung liegt nahe, daß in den Einschlüssen u.a. phagozytierte Immunkomplexe vorliegen.

LE-Zellen sind vielkernige Leukozyten, die einen Einschluß tragen. Vorkommen bei Lupus Erythematodes.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Problemstellung

Die spezifische Granulierung der Granulozyten kann nach Benzoleinwirkung durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pseudoisocyaninchlorid im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (s.u.).

Bei entzündlichen Gelenksprozessen kommt es zur Degranulation von Granulozyten und damit zur Freisetzung lysosomaler Enzyme.

Ziel dieser Arbeit ist, zu untersuchen, ob in der Synovialflüssigkeit entzündlicher Gelenke -im Unterschied zu nichtentzündlichen- eine Anzahl degranulierter Granulozyten zu beobachten ist.

Ferner soll untersucht werden, ob zwischen der Zahl degranulierter Granulozyten und dem Grad der Entzündung eine Korrelation erkennbar ist.

Die Fluoreszenzfärbung der Ausstriche wird zusätzlich mit der herkömmlichen Pappenheimfärbung verglichen.

2. Material und Methode

a) Material

1. Hyaluronidase
2. 5×10^{-4} molare wäßrige Pseudoisocyaninchloridlösung (PIC)
3. Benzol
4. Fluoreszenzmikroskop mit Zubehör

ad 1.: Eine Behandlung des Punktats mit Hyaluronidase ist vor allem deshalb notwendig, da die Hyaluronsäure als Glykosaminoglykan vom verwendeten Fluoreszenzfarbstoff (PIC) angefärbt würde (s.u.) und so das Ausstrichpräparat verschleiern würde.

ad 2.: Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs Pseudoisocyaninchlorid (PIC):
PIC ist ein kationischer Farbstoff, der sich an anionische Gruppen bindet. Die Abstände der negativen Ladungen müssen in einem bestimmten Bereich liegen, damit der Farbstoff zu Polymeren aggregiert und somit seine Fluoreszenzeigenschaft erhält. Entsprechende polyanionische Matrizen sind z.B. Nukleinsäuren und Glykosaminoglykane (3,4,6).
An Leukozyten lassen sich durch Vitalfärbung mit PIC bestimmte Strukturen darstellen:

ad 3.: Nach Inkubation mit Benzol (oder Chloroform) lassen sich die Granula der Granulozyten selektiv färben und sind somit optimal sichtbar. Ohne Vorbehandlung mit einem lipophilen Lösungsmittel fehlt die Darstellung der Granulozyten-Granula; die Granulozyten weisen dann nur fadenförmige grüngelbe Strukturen auf (4).

ad 4.: Zur Auswertung diente ein Fluoreszenzmikroskop "Ortholux II" von Leitz mit einem Ölimmersionsobjektiv 100/1,30, wobei die Präparate in Auflichtfluoreszenz mit einer Xenon-Hochdrucklampe 75 in Verbindung mit einem Blauerregerfilter (BG 12, Leitz) und einem Sperrfilter (TG 510, Leitz) untersucht wurden.

b) Methode

Zu allen Untersuchungen wurde frisches, maximal 1 Stunde altes Gelenkpunktat verwendet.

Etwa 500 - 1000 µl Punktat wurden jeweils in ein vorbereitetes Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Hyaluronidase überführt und 20 Minuten durchmischt.
Von dieser nicht weiter behandelten Synovialflüssigkeit wurde jeweils ein Ausstrich für eine Pappenheim-Färbung angefertigt.

Aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 300 µl Synovialflüssigkeit in ein EDTA-Röhrchen überführt, 5 µl Benzol hinzugefügt und genau 1 Minute geschüttelt. Im Anschluß wurden 300 µl $5x10^{-4}$molare wäßrige Pseudoisocyaninchloridlösung zugegeben und 20 Minuten lang gefärbt.

Das Ausstreichen erfolgte möglichst schonend auf gereinigte Objektträger.

Da sich die Fluoreszenzfärbung lagerstabil zeigte, mußte die Auswertung nicht am gleichen Tag vorgenommen werden.

c) Beschreibung der benzolinkubierten und PIC-gefärbten Synoviazellbilder

Prinzipiell zeigen Zellkern und Zellplasma eine grüngelbe Untergrundfluoreszenz, während die leuchtend gelbe Granulozyten-Granulation im Vordergrund steht.

Leider erscheinen die Ausstriche, vermutlich durch restliche Hyaluronsäure, etwas verschwommen (s. Diskussion).

Läßt man ein Präparat unverändert im Strahlengang des Mikroskops liegen, so werden die zu untersuchenden Objekte im mikroskopischen Bild im Verlauf von ca. 1 Minute zunehmend deutlicher, indem der Hintergrund dunkler und die Granulation der Granulozyten leuchtender wird.

Granulozyten sind am deutlichsten an der leuchtend gelben Granulation erkennbar, welche normalerweise den typischen Zellkern verdeckt. Dieser ist nur bei geringer Granulation sichtbar und wird bei vollständiger Degranulation, zusammen mit dem aufgelockerten Plasma, zum Unterscheidungsmerkmal.

Als "degranulierte Granulozyten" bezeichnen wir im folgenden Granulozyten mit keiner oder wenig Granulation, d.h. weniger als 25 % des Normalen.

Eosinophile Granulozyten fallen durch dicke grüne Granula auf. Sie waren nur selten zu beobachten und wurden bei den Granulozyten mitgezählt.

Basophile Granulozyten wurden nicht beobachtet.

Die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) sind, wie auch in anderen Färbemethoden, an Größe und Kernform zu erkennen. Die Differenzierung ist jedoch schwieriger als bei den üblichen Färbungen.

Thrombozyten sind in der Fluoreszenzfärbung besser ohne vorherige Benzolinkubation sichtbar.

Abb. 1: Granulozyten in der Synovialflüssigkeit eines Patienten mit chronischer Polyarthritis. Fluoreszenzfärbung mit Pseudoisocyaninchlorid nach Benzolinkubation.
Die Granulozyten-Granula sind deutlich erkennbar, in der oberen Zelle auch der Kern.
Unten: Granulierter Granulozyt
Oben: Wenig granulierter ("degranulierter") Granulozyt

3. Ergebnisse

Es wurden 16 entzündliche Gelenkergüsse untersucht (darunter 11 chronische Polyarthritiden und 3 HLA-B 27- positive Monarthritiden), und 5 nichtentzündliche (traumatische und arthrotische) Ergüsse; außerdem 1 aktivierte Arthrose.

Notiert wurden Diagnose, Medikamente, entzündliche Laborparameter, punktiertes Gelenk, Menge und Aussehen des Punktats, Zellzahl und PIC-gefärbtes Differentialsynoviazellbild.

Bei den nichtentzündlichen und bei einigen entzündlichen Fällen lagen diese Angaben nicht vollständig vor.

Die Diagnosen wurden anhand von Anamnese, Verlauf, klinischen sowie klinisch-chemischen Befunden erstellt.

3.1. Entzündliche Fälle

1. H.R., männlich, 58 Jahre. Diagnose: c.P.
   Medikamente: Coxigon, Gold, Lederlon 1 mg intraartikulär (14 Tage vorher). Labor: BKS 80, CRP +
   Punktat: li Knie, 150 ml, hellgelb, trüb ++,
   Zellzahl 14 650. Diff.: Granulozyten 92 (granuliert 63, degranuliert 29), mononukleäre Z. 3, nicht zu differenzierende Zellen 5; ausgezählt 100 Zellen

2. K.S., männlich, 52 Jahre. Diagnose: c.P., ANA+, Kniegelenksendoprothese li., Z.n. Synovektomie li.
   Medikamente: Felden 20, Gold, Urbason.
   Labor: BKS 17, CRP+. Punktat: li Knie, 44 ml, gelb, trüb ++, Zellzahl 8 500. Diff.: Granulozyten 25 (50 %), (granuliert 25 (50 %), degranuliert 0), mononukleäre Z. 15, n.z.d.Z. 10; ausgezählt 50 Zellen

3. C.B., weiblich, 31 Jahre. Diagnose: c.P., ANA +
   Medikamente: Gold, Proxen. Labor: BKS 18, CRP n.b.

Abkürzungen: c.P.= chronische Polyarthritis; Diff.= Differentialsynoviazellbild; n.z.d.Z.= nicht zu differenzierende Zellen; n.b.= nicht bekannt

Punktat: li Knie, 25 ml, strohgelb, trüb. Zellzahl 14 300. Diff.: Granulozyten 97 (granuliert 61, degranuliert 36), mononukleäre 0, n.z.d.Z. 3; ausgezählt 100 Zellen

4. H.K., weiblich, 24 Jahre. Diagnose: c.P., Medikamente: Gold, Amuno. Labor: BKS 31, CRP neg.
Punktat: re Knie, 40 ml, hellgelb, trüb++, Zellzahl 18500
Diff.: Granulozyten 96 (granuliert 87, degranuliert 9), mononukleäre 2, n.z.d.Z. 2, ausgezählt 100 Zellen

5. K.H., weiblich, 56 Jahre. Diagnose: c.P., Medikamente: Scherisolon, Resochin, Ultralan, Voltaren. Labor: BKS 43, CRP++. Punktat: li Knie, 3 ml, hellgelb, trüb++. Zellzahl 22 600. Diff.: Granulozyten 98 (granuliert 79, degranuliert 19), mononukleäre 0, n.z.d.Z. 2; ausgezählt 100 Zellen

6. H.H., weiblich, 35 Jahre. Diagnose: c.P., Medikamente: Amuno, Dolo-Attritin. Labor: BKS 6, CRP neg.
Punktat: li Knie, 16 ml, blutig, trüb++, Zellzahl 10200
Diff.: Granulozyten 97 (granuliert 84, degranuliert 13), mononukleäre 1, n.z.d.Z. 2; ausgezählt 100 Zellen

7. M.M., weiblich, 56 Jahre. Diagnose: c.P., ANA+, Medikamente: Voltaren, Scherisolon. Labor: BKS 35, CRP++. Punktat: li Knie, 40 ml, strohgelb, trüb+, Zellzahl 16 350. Diff.: Granulozyten 94 (granuliert 72, degranuliert 22), mononukleäre 0, n.z.d.Z. 6; ausgez. 100 Zellen

8. R.P., weiblich, 34 Jahre. Diagnose: c.P., Medikamente: Felden, Goldbehandlung unterbrochen. Labor: BKS 33, CRP n.b. Punktat: li Knie, 5 ml, strohgelb, trüb+, Flockung, Zellzahl 11 850. Diff.: Granulozyten 98 (granuliert 66, degranuliert 32), mononukleäre 1, n.z.d.Z. 1; ausgezählt 100 Zellen

9. S.W., männlich, 26 Jahre. Diagnose: c.P., keine infektiöse Arthritis (Kultur aerob und anaerob neg.); Medikamente: Scherisolon, Felden. Labor: BKS 83, CRP++.

Punktat: re Knie, 22 ml, strohgelb, trüb++, Zellzahl 60 000. Diff.: Granulozyten 100 (granuliert 35, degranuliert 65), mononukl. Z. 0, n.z.d.Z. 0; ausgez. 100 Z.

10. M.H., männlich, 61 Jahre. Diagnose: Rheumatische Arthritis, seit 6 J. rez. Ergüsse (z.Zt. geringe entzündliche Aktivität). Medikamente: Delphicort intraartikulär (vor 24 Tagen). Labor: n.b.
Punktat: re Knie, 10 ml, gelb, trüb, Zellzahl und Rheumafaktor im Punktat seit 1 Monat unauffällig.
Diff.: Granulozyten 98 (granuliert 93, degranuliert 5), mononukl. Z. 0, n.z.d.Z. 2; ausgezählt 100 Zellen

11. C.W., weiblich, 8 Jahre. Diagnose: Juvenile Oligoarthritis. Medikamente: n.b. Labor: n.b.
Punktat: Zellzahl 4 500. Diff.: Granulozyten 74 (granuliert 58, degranuliert 16), mononukleäre Z. 12, n.z.d.Z. 14; ausgezählt 100 Zellen

12. F.D., weiblich, 71 Jahre. Diagnose: c.P.
Medikamente: n.b. Labor: n.b. Punktat: Zellzahl 6 000. Diff.: Granulozyten 94 (granuliert 80, degranuliert 14), mononukl. Z. 3, n.z.d.Z. 3; ausgez. 100 Z.

13. C.B., männlich, 16 Jahre. Diagnose: Monarthritis, HLA-B 27-pos. Medikamente: n.b. Labor: n.b.
Punktat: Zellzahl 20 600. Diff.: Granulozyten 84 (granuliert 75, degranuliert 9), mononukl. Z. 14, n.z.d.Z. 2; ausgezählt 100 Zellen

14. H.E., männlich, 15 Jahre. Diagnose: Monarthritis, HLA-B 27-pos. Medikamente: n.b. Labor: n.b.
Punktat: Zellzahl 9 300. Diff.: Granulozyten 87 (granuliert 77, degranuliert 10), mononukl. Z. 11, n.z.d.Z. 2; ausgezählt 100 Zellen

15. K.W., weiblich, 58 Jahre. Diagnose: c.P.
Medikamente: n.b. Labor: n.b.
Diff.: Granulozyten 95 (granuliert 83, degranuliert 12), mononukl. Z. 5, n.z.d.Z. 0; ausgezählt 100 Zellen

16. K.H., weiblich, 27 Jahre. Diagnose: Arthritis, HLA-B 27-pos. Medikamente: n.b. Labor: n.b. Punktat: Zellzahl n.b. Diff.: Granulozyten 78 (granuliert 70, degranuliert 8), mononukleäre 8, n.z.d.Z. 14; ausgezählt 100 Z.

3.2. Nichtentzündliche Fälle

I. I.P., männlich, 31 Jahre. Diagnose: Z.n. Meniskusoperation. Medikamente: keine. Labor: n.b.
Punktat: re Knie, 22 ml, gelb, klar. Zellzahl n.b.
Diff.: Granulozyten 1 (=4%) (granuliert 1 (=4%), degranuliert 0), mononukleäre 4, n.z.d.Z. 20; ausgezählt 25 Z.

II. A.P., männlich, 56 Jahre. Diagnose: Z.n. Meniskusoperation. Medikamente: keine. Labor: n.b.
Punktat: li Knie, 15 ml, gelb, klar. Zellzahl n.b.
Diff.: Granulozyten 3 (=12%) (granuliert 3 (=12%), degranuliert 0), mononukleäre 19, n.z.d.Z. 3; ausgezählt 25 Zellen

III. H.I., weiblich, 70 Jahre. Diagnose: Retropatellararthrose. Medikamente: n.b. Labor: n.b.
Punktat: li Knie, 3 ml, blutig, trüb. Zellzahl n.b.
Diff.: Granulozyten 1 (=4%) (granuliert 1 (=4%), degranuliert 0), mononukleäre 12, n.z.d.Z. 12; ausgezählt 25 Z.

IV. J.V., männlich, 33 Jahre. Diagnose: Reizerguß nach ält. Trauma. Medikamente: keine. Labor: n.b.
Punktat: li Knie, 30 ml, hellgelb, trüb. Zellzahl n.b.
Diff.: Granulozyten 17 (=68%) (granuliert 17 (=68%), degranuliert 0), mononukleäre 7, n.z.d.Z. 1; ausgezählt 25 Zellen

V. N.S., weiblich, 35 Jahre. Diagnose: Retropatellararthrose. Medikamente: n.b. Labor: n.b.
Punktat: li Knie, 10 ml, strohgelb, fast klar. Zellzahl n.b. Diff.: Granulozyten 16 (=64%) (granuliert 15 (=60%), degranuliert 1 (=4%)), mononukleäre 9, n.z.d.Z. 0; ausgezählt 25 Zellen

VI. (als primär nichtentzündlicher Fall:) E.T., weiblich, 54 Jahre. Diagnose: Aktivierte Gonarthrose. Medikamente: n.b., Labor: n.b. Punktat: Zellzahl 3 960, Diff.: Granulozyten 10 (=100%), alle nur wenig granuliert; andere Zellen 0; ausgezählt 10 Zellen

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Ergebnisse, nach Diagnosen geordnet

Nr.	Diagnose	Medikamente	Zellzahl (/µl)	Granulozyten (%) gesamt	degranuliert
Entzündliche Fälle					
1.	c.P.	G A C *	14 650	92 %	29 %
2.	c.P.	G A C	8 500	50 %	0 %
3.	c.P.	G A	14 300	97 %	36 %
4.	c.P.	G A	18 500	96 %	9 %
5.	c.P.	A C	22 600	98 %	19 %
6.	c.P.	A	10 200	97 %	13 %
7.	c.P.	A C	16 350	94 %	22 %
8.	c.P.	(G) A	11 850	98 %	32 %
9.	c.P.	A C	60 000	100 %	65 %
12.	c.P.	n.b.	6 000	94 %	14 %
15.	c.P.	n.b.	n.b.	95 %	12 %
13.	HLA-B 27	n.b.	20 600	84 %	9 %
14.	HLA-B 27	n.b.	n.b.	87 %	10 %
16.	HLA-B 27	n.b.	n.b.	78 %	8 %
10.	Rheum.Arthr.	C *	n.b.	98 %	5 %
11.	Oligoarthr.	n.b.	4 500	74 %	16 %
Primär nichtentzündliche Fälle					
I.	traumat.	-	n.b.	4 %	0 %
II.	traumat.	-	n.b.	12 %	0 %
III.	degen.	n.b.	n.b.	4 %	0 %
IV.	degen.	n.b.	n.b.	68 %	0 %
V.	degen.	n.b.	n.b.	64 %	4 %
VI.	Akt. Arthr.	n.b.	3 960	100 %	100 % (wenig gran.)

Medikamente: G = Gold, A = Antirheumaticum, C = Corticoid
* = intraartikulär, n.b.= nicht bekannt

Granulozyten (gesamt)

Erwartungsgemäß ist der Anteil der Granulozyten am Differentialsynoviazellbild bei den nichtentzündlichen Fällen wesentlich geringer als bei den entzündlichen.

Degranulierte Granulozyten

a) Entzündliche Fälle: Der Prozentsatz der degranulierten Granulozyten im Differentialsynoviazellbild liegt in einem Fall bei 0 %, in einem (hochentzündlichen) Fall bei 65 %. Bei allen anderen 14 Fällen liegt er zwischen 5 % und 36 %.

Es zeichnet sich ab, daß dieser Prozentsatz bei den HLA-B 27-positiven Monarthritiden etwas niedriger liegt als bei den chronischen Polyarthritiden.

b) Nichtentzündliche Fälle: Bei der aktivierten Arthrose, einer primär nichtentzündlichen Gelenkerkrankung, welche in einen entzündlichen Verlauf übergeht, fanden sich alle 10 beobachteten Granulozyten nur wenig granuliert.

Bei den anderen 5 nichtentzündlichen Fällen wurde nur einmal ein degranulierter Granulozyt gefunden.

4. Auswertung der Ergebnisse

4.1. Vergleich der Differentialsynoviazellbilder bei entzündlichen und nichtentzündlichen Gelenkerkrankungen

	entzündlich	nichtentzündlich
Anzahl der Fälle	16	5 (ohne Aktivierte Arthrose)
Zellzahl/µl		
Mittelwert:	16 700	1 000
Streubreite:	6 000-60 000	50 - 6 500 (lt. Literatur, 1)
Granulozyten (gesamt)		
Mittelwert:	90 %	30 %
Streubreite:	50% - 100%	4% - 68%
Degranulierte Granulozyten		
Mittelwert:	19 %	1 %
Streubreite:	0% - 65%	0% - 4%
(ohne Extreme:	5% - 36%)	

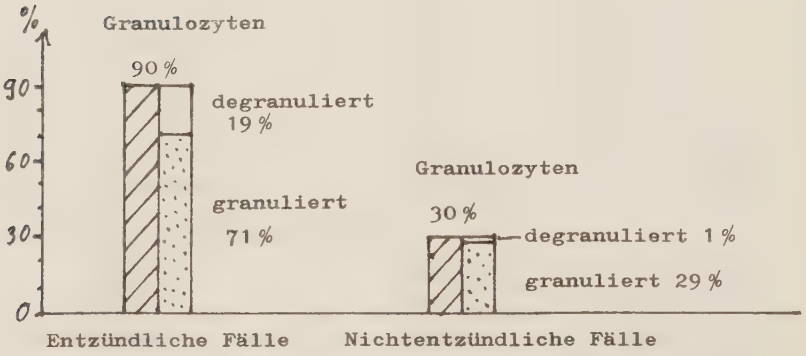

Abb. 2: Vergleich der relativen Granulozytenzahlen (gesamt, degranuliert und granuliert; Mittelwerte) im Differentialsynoviazellbild bei entzündlichen und nichtentzündlichen Gelenkerkrankungen

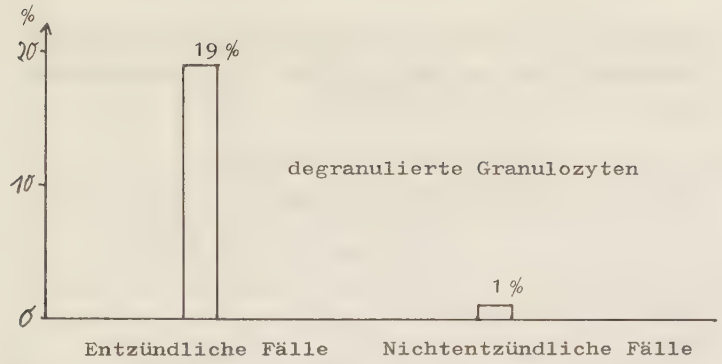

Abb. 3: Vergleich der relativen Zahl degranulierter Granulozyten (Mittelwerte) im Differentialsynoviazellbild bei entzündlichen und nichtentzündlichen Gelenkerkrankungen

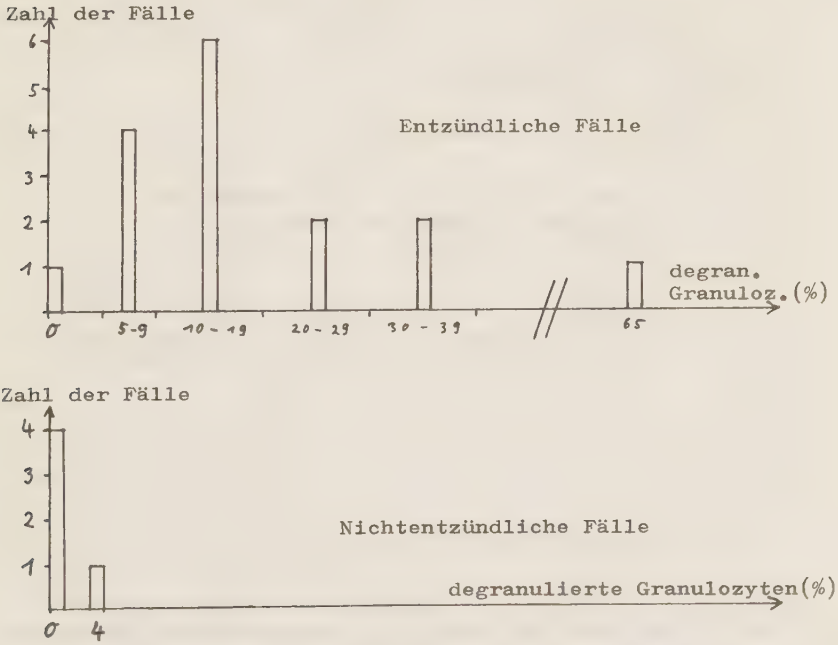

Abb. 4: Häufigkeitsverteilung der relativen Zahl degranulierter Granulozyten im Differentialsynoviazellbild bei entzündlichen und nichtentzündlichen Gelenkerkrankungen

4.2. Vergleich der Differentialsynoviazellbilder bei verschiedenen Schweregraden entzündlicher Gelenkerkrankungen

4.2.1. Vergleich: Chronische Polyarthritis - HLA-B 27- positive Monarthritis

	c.P.	HLA-B 27
Anzahl der Fälle	11	3
Zellzahl/µl		
Mittelwert:	18 300	15 000
Streubreite:	6 000 - 60 000	9 300 - 20 600
Granulozyten		
Mittelwert:	92 %	83 %
Streubreite:	50 % - 100 %	78 % - 87 %
Standardabw.:	± 14 %	± 4,6 %
Degranulierte Granulozyten		
Mittelwert:	23 %	9 %
Streubreite:	0 % - 65 %	8 % - 10 %

(Die Standardabweichung wurde nur da angegeben, wo mit einer Normalverteilung gerechnet werden kann)

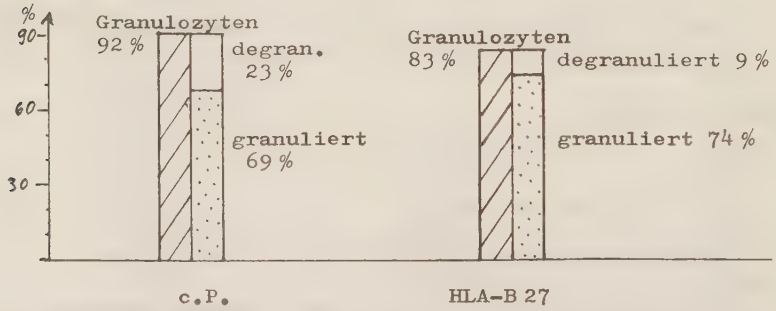

Abb. 5: Vergleich der relativen Granulozytenzahlen (gesamt, degranuliert und granuliert; Mittelwerte) im Differentialsynoviazellbild bei chronischer Polyarthritis und HLA-B 27-positiver Monarthritis

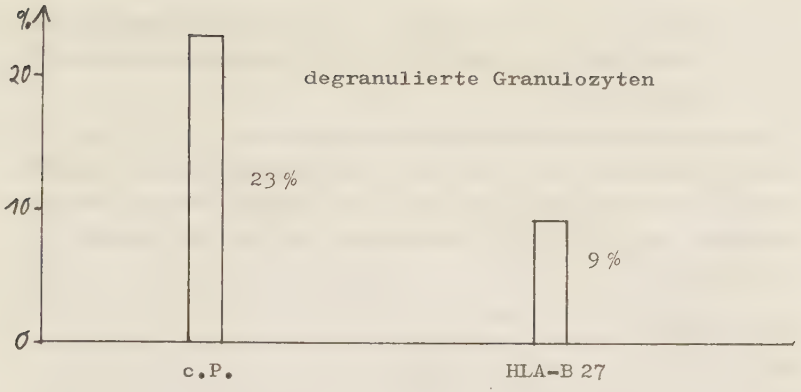

Abb. 6: Vergleich der relativen Zahl degranulierter Granulozyten (Mittelwerte) im Differentialsynoviazellbild bei chronischer Polyarthritis und HLA-B 27- positiver Monarthritis

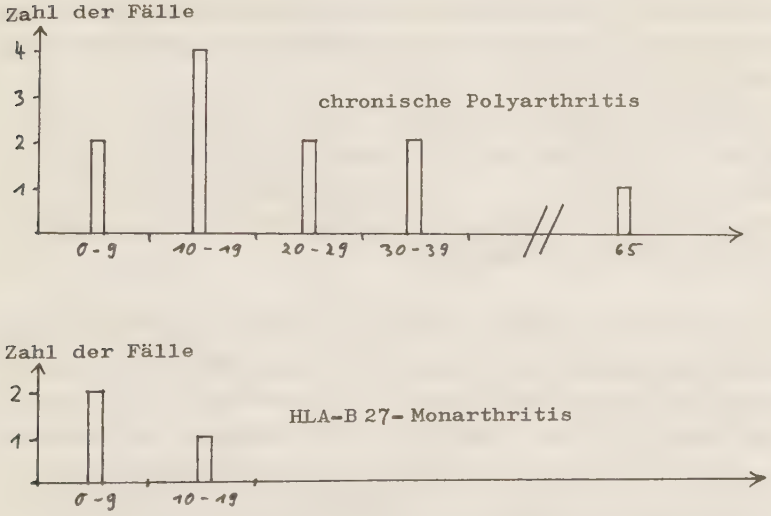

Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der relativen Zahl degranulierter Granulozyten im Differentialsynoviazellbild bei chronischer Polyarthritis und HLA-B 27- pos. Monarthritis

4.2.2. Vergleich der Differentialsynoviazellbilder in Abhängigkeit von entzündlichen klinischen Parametern (BKS, CRP)

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ließ keine Korrelation mit der relativen Zahl degranulierter Granulozyten im Synoviazellbild erkennen, ebenso das c-reaktive Protein, welches nur in wenigen Fällen und nur qualitativ erfaßt war.

Wertetabelle:

BKS (mm/1h)	6	17	18	31	33	35	43	80	83
degranulierte Granulozyten(%)	13	0	36	9	32	22	19	29	65

4.3. Färbung der Synovialflüssigkeit nach Pappenheim

Die Färbung der Synovia-Ausstriche nach Pappenheim stellt die Granulierung der Granulozyten als Inhomogenität des Zellplasmas dar. Eine spezifische Anfärbung der Granula -wie dies bei der Fluoreszenzfärbung mit PIC der Fall ist- findet nicht statt.

Wir konnten jedoch beobachten, daß die Granulierung der Granulozyten in den nach Pappenheim gefärbten Synovia-Ausstrichen spärlicher war als in Blutausstrichen.
Eine quantitative Erfassung dieses Phänomens war selbstverständlich nicht möglich.

4.4. Ursachen von Fehlern zufälliger und systematischer Art

Ausgezählt wurden die Präparate mehrmals an verschiedenen Tagen. Die angegebenen Resultate sind Mittelwerte, wobei die Einzelwerte nur unwesentlich von einander abwichen.

Doppelt hergestellte fluoreszenzgefärbte Differentialsynoviazellbilder zeigen, daß der zufällige Fehler beim Differenzieren der Zellen gering war (ca. 2 % - 3 %):

a) Punktat (Nr.1) in zwei getrennten Arbeitsgängen verarbeitet:

Granulozyten 92 bzw. 94
degranulierte Granulozyten 29 bzw. 28
bei 100 ausgezählten Zellen

b) Zehn Tage auseinanderliegende Punktionen eines traumatischen Ergusses (Nr.II):
Granulozyten 3 bzw. 3
degranulierte Granulozyten 0 bzw. 0
bei 25 ausgezählten Zellen

c) Punktion des rechten und linken Knies eines Patienten (Nr.4) am selben Tag:
Granulozyten 96 bzw. 99
degranulierte Granulozyten 9 bzw. 11
bei 100 ausgezählten Zellen

Zufälliger Fehler auf Grund der Fallzahlen:
Für die nichtentzündlichen Gelenkpunktate ist zu bedenken, daß hier erstens eine geringe Fallzahl (n=5), zweitens eine geringe Zellzahl pro μl, drittens ein geringer Anteil an Granulozyten vorliegt. Die relative Zahl degranulierter Granulozyten muß unter diesem Aspekt betrachtet werden.

(Bei weiteren Untersuchungen könnte aus den nichtentzündlichen Punktaten ein Zellsediment durch vorsichtige Zentrifugierung hergestellt werden, um eine größere Zahl von Zellen differenzieren zu können.)

Auch die Zahl der HLA-B 27 - positiven Fälle ist mit n=3 sehr gering.

Systematische Fehler können in erster Linie durch mangelhafte Ausstrichtechnik entstanden sein (zu wenig schonendes Ausstreichen, ungleiche Verteilung der verschiedenen Zellarten auf dem Objektträger).

Ein mangelhafter Ausstrich kann vermutet werden bei Fall Nr.2, dem einzigen entzündlichen, bei dem 0 % degranulierte Granulozyten gezählt wurden. Hier konnten trotz einer Zellzahl von 8500/μl nur 50 Zellen ausgezählt werden.

III. DISKUSSION

1. Degranulation von Granulozyten und lysosomale Enzyme

Die arthritische Zerstörung des Gelenkknorpels erfolgt durch lysosomale Enzyme. Diese stammen aus Granulozyten und synovialen Randzellen, die Immunkomplexe phagozytiert haben (→ Ragozyten!). Auf diese Weise werden auch andere Entzündungsstoffe frei, wodurch die Entzündung und der Schmerz unterhalten wird. (2)

Ragozyten (= Einschlüsse tragende Leukozyten) kommen in Gelenkergüssen mit unterschiedlicher entzündlicher Aktivität verschieden häufig vor:

seropositive c.P.	88 %	Ragozyten	
Gicht	43 %	"	
M. Bechterew	38 %	"	
Arthrose	10 %	"	(2)

Die lysosomalen Enzyme (z.B. β-N-Azetylglukosaminidase und Leukozytenelastase) sind in den Granula der Granulozyten enthalten. Durch die Degranulation werden diese Enzyme freigesetzt.
Sie sind besonders bei der chronischen Polyarthritis, je nach Entzündungsgrad, erhöht. In unterschiedlichen Schweregraden arthritischer Krankheitsbilder werden Abstufungen lysosomaler Enzymaktivitäten beschrieben. Diese sind z.B. bei der chronischen Polyarthritis größer als beim M. Bechterew:

	β-N-Azetylglukosaminidase (U/l)		
	Mittelwert	Streubreite	
c.P.(Männer)	17,1	3,1 - 49,4	
c.P.(Frauen)	15,9	4,9 - 36,4	
Gonarthrosis deformans	7,4	3,9 - 9,7	
M. Bechterew	6,9	1,9 - 15,5	
Gicht	6,0	3,7 - 7,1	(nach 1)

Corticoide hemmen die Degranulation der Granulozyten und damit die Freisetzung lysosomaler Enzyme.
Dies wird durch einen in-vitro-Versuch von SUSCHKE (pers. Mitteilung) bestätigt:
In Heparinblut, das mit Endotoxin (von E. Coli oder Salmonellen) in einer Konzentration, welche einer Sepsis entspricht, inkubiert wird, degranulieren die Granulozyten vollständig. Dieser Effekt tritt nicht auf, wenn das Blut vorher mit einem Corticoid (oder auch mit Chloroquin) behandelt wird, in einer Konzentration, welche höheren therapeutischen Dosen (z.B. Hirnödemprophylaxe) entspricht.

Es kann also tatsächlich von einer "membranstabilisierenden Wirkung" der Corticoide gesprochen werden.

Vergleich mit den eigenen Untersuchungen:

Erwartungsgemäß ist der relative Anteil degranulierter Granulozyten bei den hier untersuchten entzündlichen Fällen wesentlich höher als bei den nichtentzündlichen. Zieht man außerdem in Betracht, daß gleichzeitig mit der relativen Zahl degranulierter Granulozyten im allgemeinen auch die absolute Zellzahl mit dem Grad der Entzündung ansteigt, so muß die Menge freigesetzter lysosomaler Enzyme um ein Vielfaches höher eingeschätzt werden.

Das HLA-B 27 ist als genetisch disponierender Faktor für M. Bechterew (auch M. Reiter, Uveitis) bekannt, dessen Verlauf im Vergleich zur chronischen Polyarthritis weniger dramatisch ist. Auch die entzündlichen Parameter der gängigen Synoviaanalyse weisen darauf hin (s.o.).
Die HLA-B 27 - positiven Monarthritiden in unseren Untersuchungen zeigen ebenfalls eine Tendenz zu geringerer Degranulation als die c.P.-Fälle. Allerdings ist die Zahl der untersuchten Fälle gering.

Eine Korrelation zwischen der Zahl degranulierter Granulozyten und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit als entzündlichem klinischen Parameter ist in unseren Untersuchungen nicht nachzuweisen.

Zwei der von uns untersuchten Arthritiden waren vor der Punktion bereits mit intraartikulären Injektionen eines Corticoids behandelt worden:

Fall 1, eine c.P. mit hoher Entzündungsaktivität; 14 Tage vorher 1 mg Lederlon intraartikulär. Im Synoviazellbild waren 29 % degranulierte Granulozyten.

Fall 10, eine Rheumatische Arthritis, z. Zt. mit geringer Entzündungsaktivität; 24 Tage vorher Delphicort intraartikulär. Im Synoviazellbild waren 5 % degranulierte Granulozyten.

Über eine Verminderung der Degranulation von Granulozyten durch Corticoide kann in diesen Fällen noch nichts ausgesagt werden.
Es wären sicher umfangreichere Untersuchungen, unter Berücksichtigung der Halbwertszeiten der verschiedenen Präparate, interessant.

2. Möglicher Stellenwert der Pseudoisocyaninchlorid-Färbung in der diagnostischen Gelenkpunktion

Die Analyse der Synovialflüssigkeit trägt sowohl zur Erstellung der Diagnose bei (nichtentzündliche, entzündliche, infektiöse Gelenkerkrankung?), als auch zur Beurteilung des Entzündungsgrades.

Die PIC-Färbung im Vergleich mit der Pappenheim-Färbung

Bei den herkömmlichen Methoden der Zelldifferenzierung wie der Pappenheim-Färbung werden Leukozytenzahl, Anteil an Granulozyten bzw. mononukleären Zellen und Vorkommen besonderer Zellen (Ragozyten, LE-Zellen) beurteilt.

Die PIC-Färbung ermöglicht eine Unterscheidung zwischen granulierten und wenig oder nicht granulierten Granulozyten, was mit den herkömmlichen Färbemethoden nicht möglich ist.

Die mononukleären Zellen sind jedoch mit der Pappenheim-Färbung besser zu differenzieren als mit der PIC-Färbung.

Die Beobachtung, daß die Granulierung der Granulozyten in den nach Pappenheim gefärbten Synovia-Ausstrichen spärlicher ist als in Blutausstrichen, wurde bisher noch nicht beschrieben.

Differentialdiagnose:
Entzündliche - nichtentzündliche Gelenkerkrankung

Das unterschiedliche Ausmaß der Degranulierung von Granulozyten bei entzündlichen un nichtentzündlichen Gelenkergüssen ist deutlich.
Als interessantes Beispiel mag Fall VI dienen, der einzige primär nichtentzündliche Fall mit überwiegend degranulierten Granulozyten: Es handelt sich um eine aktivierte Arthrose. Wie die klinischen Symptome weist auch das PIC-gefärbte Zellbild auf den Übergang zum Entzündlichen hin.

Offensichtlich ergänzt das PIC-gefärbte Differentialzellbild die zur Diagnosestellung erforderlichen Untersuchungen, wie dies auch das herkömmlich gefärbte tut (s. Einleitung).

Differentialdiagnose: Septische - nichtinfektiöse Arthritis

SUSCHKE beobachtete, daß in Eiter alle Granulozyten degranuliert sind (pers. Mitteilung).
Bei den von uns untersuchten Arthritiden (alle nichtinfektiös) war immer nur ein Teil der Granulozyten degranuliert, niemals alle.
Interessant ist unter diesem Aspekt Fall 9, eine hochentzündliche nichtinfektiöse Arthritis mit einer Leukozytenzahl von 60 000, die für eine septische Arthritis verdächtig wäre; hier waren immer noch 35 % der Granulozyten granuliert.

Es ist zu erwarten, daß die PIC-Färbung auf diese Weise eine Unterscheidung zwischen septischer und nichtinfektiöser Arthritis ermöglicht.

Bisher dient zur raschen Unterscheidung die Bestimmung des Laktats in der Synovialflüssigkeit (septische Arthritis >120 mg/dl, nichtinfektiöse Arthritis <110 mg/dl).

3. Bisherige Unvollkommenheit der Methode

Im Gegensatz zur Anwendung der Methode bei Blut sind die Synovia-Ausstriche etwas verschwommen, was vermutlich auf eine nicht optimale Behandlung der Hyaluronsäure zurückzuführen ist.
Eine Pufferung der Hyaluronidase auf ein pH von 4 - 5 wäre zu versuchen, würde aber die Handhabung der Methode erschweren.

Aufgrund der Schwierigkeit, an entsprechende, frische Gelenkpunktate zu gelangen, mußten wir uns mit einer relativ geringen Fallzahl begnügen. Daher ist die vorliegende Arbeit als Pilotstudie anzusehen, in welcher lediglich deutliche Tendenzen aufgezeigt werden.
Die Ergebnisse müßten durch weitere Untersuchungen bestätigt oder erweitert werden. Dabei wäre eine gleichzeitige Bestimmung der Leukozyten-Elastase zur weiteren Objektivierung sinnvoll.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Die Granulierung der Granulozyten kann nach Benzoleinwirkung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pseudoisocyaninchlorid sichtbar gemacht werden.
Bei entzündlichen Gelenkprozessen kommt es zur Degranulation von Granulozyten und damit zur Freisetzung lysosomaler Enzyme.

Es wurden Differentialsynoviazellbilder von 16 entzündlichen und 5 nichtentzündlichen Gelenkergüssen ausgewertet, dazu von einer aktivierten Arthrose.
Die entzündlichen Ergüsse erbrachten einen Mittelwert von 19 % nicht oder wenig granulierten Granulozyten;
bei den nichtentzündlichen wurde nur 1 degranulierter Granulozyt gefunden (bei je 25 ausgezählten Zellen).
Das Bild der aktivierten Arthrose entsprach dem der entzündlichen Ergüsse.

Unter den entzündlichen Gelenkerkrankungen befanden sich drei HLA-B 27- positive Monarthritiden. Bei diesen war der Anteil an nicht oder wenig granulierten Granulozyten geringer als bei den 11 Fällen von chronischer Polyarthritis.

Praktische Bedeutung gewinnt die beschriebene Färbemethode möglicherweise in der Unterscheidung von septischen und nichtinfektiös-entzündlichen Gelenkerkrankungen:
In Eiter wurden 100 % degranulierte Granulozyten beobachtet, was bei nichtinfektiösen Arthritiden nie der Fall war.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1 Greiling H. und Kleesiek K.: Folia rheumatologica, 1978, Documenta Geigy

2 Gross R., Schölmerich P.: Lehbuch der Inneren Medizin, Schattauer Verl., 5. Aufl. 1977, 963-977

3 Gschwind K.: Zur Struktur von Pseudoisocyanin-Aggregaten. Diss. TU München 1974

4 Schöberl H.: Färbeverhalten mit Pseudoisocyaninchlorid von Leukozyten bei Normalpersonen und Patienten mit leukämischen Erkrankungen, Diss. LMU München 1982

5 Suschke J.: Glykosaminoglykane in Blut- und Knochenmark-Zellen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen. Laboratoriumsmedizin 2 (1977)

6 Suschke J., Gschwind G., Rohde G.: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis saurer Mukopolysaccharide in menschlichen Blut- und Knochenmarkszellen. Klin. Wschr. 54, 289-290 (1976)

Herrn Prof. Dr. Suschke, Kinderpoliklinik der Universität München, danke ich für die Überlassung des Themas und ganz besonders für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn CA Dr. Miehle und Herrn OA Dr. Bartel, Sanatorium Wendelstein, Bad Aibling, und Herrn Dr. Reinhardt, Bad Aibling, danke ich für die freundliche Unterstützung und für die Überlassung von Untersuchungsmaterial.

Lebenslauf

Ich wurde am 9. Mai 1953 in Glonn als zweites Kind des Volksschulrektors Michael Stacheter und seiner Frau Johanna geboren.

Von 1959 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Westerham, ab 1964 den Humanistischen Zweig des Ignaz-Günther-Gymnasiums in Rosenheim, das ich 1973 mit dem Abitur abschloß.
Anschließend wurde ich zum Wehrdienst einberufen.

Vom Sommersemester 1975 bis zum Sommersemester 1982 studierte ich Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Acht Semester lang war ich als Studentenvertreter in der dortigen Fachschaftsvertretung tätig.
Im Juni 1982 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Seit 1980 bin ich mit der Musiklehrerin Elisabeth Stacheter, geb. Holzmeier, verheiratet.
1981 wurde meine Tochter Elisabeth geboren.